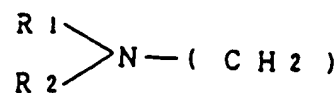


(54) CYCLODEXTRIN DERIVATIVE AND COLOR DEVELOPMENT BY USING  
SAME

(11) 4-100801 (A) (43) 2.4.1992 (19) JP  
(21) Appl. No. 2-218145 (22) 21.8.1990  
(71) IATRON LAB INC (72) TATSUHIKO YAGI(4)  
(51) Int. Cl.<sup>5</sup> C08B37/16,G01N31/22

**PURPOSE:** To provide a cyclodextrin derivative effective in enhancing the color development of a nitrophenol derivative in the visible region and useful for the measurement of enzymatic activity, etc., by covalently bonding a plurality of specified basic functional groups to cyclodextrin.

**CONSTITUTION:** A cyclodextrin derivative having at least three covalently bonded basic functional groups of a structure of the formula (wherein R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> are each 1-3C lower alkyl or H; and n is 1-3) is produced by, for example, reacting  $\alpha$ ,  $\beta$  or  $\gamma$ -cyclodextrin with an excess of a dialkylaminoalkyl chloride. Because this derivative enhances the color development of a nitrophenol derivative in the visible region, it can improve the measurement accuracy when it is applied to the measurement of the activity of various enzymes by using synthetic substrates to which a nitrophenol derivative as a color developer is bonded.



⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-100801

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)4月2日

C 08 B 37/16  
G 01 N 31/22

1 2 2

7624-4C  
9015-2C

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全6頁)

⑮ 発明の名称 シクロデキストリン誘導体及びそれを用いた発色方法

⑯ 特 願 平2-218145

⑰ 出 願 平2(1990)8月21日

⑱ 発 明 者	八 木	達 彦	静岡県静岡市北1664番地の33
⑱ 発 明 者	久 田	隆 基	静岡県静岡市下島615番地の72
⑱ 発 明 者	柴 田	秀 人	東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤترون内
⑱ 発 明 者	嶋 本	三 利	東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤترون内
⑱ 発 明 者	吉 村	智 子	東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤترون内
⑲ 出 願 人	株式会社ヤترون		東京都千代田区東神田1丁目11番4号

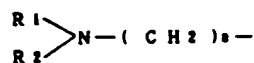
図1 発明の概要

1. 発明の名称

シクロデキストリン誘導体及びそれを用いた発色方法

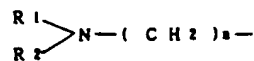
2. 特許請求の範囲

(1) 下記式の構造を有する塩基性官能基を少なくとも3分子共有結合させたシクロデキストリン誘導体。



(式中R1、R2はそれぞれ炭素数1～3個の低級アルキル基もしくは水素であって、nは1～3の整数を表す。)

(2) 下記式の構造を有する塩基性官能基を少なくとも3分子共有結合させたシクロデキストリン誘導体を用いて、ニトロフェノール誘導体を包接するすることと特徴とする発色方法。



(式中R1、R2はそれぞれ炭素数1～3個の低級アルキル基もしくは水素であって、nは1～3の整数を表す。)

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明は塩基性官能基で修飾されたシクロデキストリンに関するもので、合成基質を用いた測定法等に応用され、臨床化学検査等の分野において効果的に用いられる。更に本発明はニトロフェノール類を中性ないし酸性条件下で発色させるための試薬及び方法に関するものである。

【従来の技術及びその問題点】

ニトロフェノール類の1種である4-ニトロフェノール(パラニトロフェノールともいう)は4-ニトロフェノール基をもつ各種合成基質が特定の酵素作用により分解されるときに生成する物質で、この物質の増加を経時的に定量することにより当該酵素の活性を容易に測定することができる。例えば、フォスファターゼの活性を測定するためには4-ニトロフェノールリン酸を基質として

遊離して生じる4-ニトロフェノールを定量する。フォスフォジエステラーゼの活性測定にはビス(4-ニトロフェニル)リン酸を基質として同様に測定する。 $\beta$ -N-アセチルヘキサミニダーゼと $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼの活性測定では、合成基質として4-ニトロフェニルN-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニドが利用される。その他、各種のグリコシダーゼ(グリコシド結合の加水分解を触媒する酵素)、グルクロニダーゼ、スルファターゼ、ホスホリパーゼC、トリプシンやキモトリプシンなどのセリンプロテアーゼ、D-グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼなどに対し、4-ニトロフェニル基をもつ合成基質が開発され、臨床検査をはじめとするさまざまな分野で実用に供されている。

以上の例で示した各種酵素の活性測定が可能となる原理は、例えば4-ニトロフェニル基をもつ合成基質の場合は、その合成基質と遊離して生じる4-ニトロフェノールの間で吸光スペクトルに差があるという事実に基づいている。すなわ

ち、4-ニトロフェニル基をもつ合成基質は広いpH領域において紫外部(波長300~320nm)に強い吸光ピークをもち可視部(波長400nm以上)にはほとんど吸光を示さないが、4-ニトロフェノールはアルカリ性pH領域において電離し、400nm付近を中心とする強い吸光ピークをもつ4-ニトロフェノレート・アニオンを生じる。したがって、測定しようとする酵素の活性をアルカリ性pH領域で測定できれば、酵素反応の進行にともなう可視部の発色を400nmの吸光度増加として連続モニターでき、正確なレートアッセイが可能となる。しかし、測定しようとする酵素の最適pHが中性ないし弱酸性の領域にあれば、4-ニトロフェノールはその解離が不完全か、ほとんど解離せず、吸光スペクトルは4-ニトロフェニル基をもつ合成基質の吸光スペクトルとはほとんどオーバーラップしてしまい、発色が微弱で、反応を経時的に連続モニターすることが著しく不都合となる。そこで、現行の測定法では、酵素反応をスタートさせてから一定時

間後に、アルカリを添加して反応を停止させると同時に生成した4-ニトロフェノールを発色させ、その400nm付近の吸光度を測定するという方法が多く採用されている。すなわち、現行測定法では酵素活性測定法としてより正確で簡便な形式といわれる理想的なレートアッセイが困難だけでなく、アルカリ添加という余分な操作を必要とする。中性ないし弱酸性の領域に最適pHをもつ酵素には、例えば酸性ホスファターゼ、 $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼなど臨床化学的に重要な酵素が含まれている。これら酵素の反応を経時的に連続モニターするための有用な手段を得ることができれば、測定操作を簡便化し、測定時間を短縮できるだけでなく、測定精度をも高め、各種疾患の早期発見や診断に正確な情報を提供できる。

従って、4-ニトロフェノール及びその他のニトロフェノール類の中性ないし弱酸性のpH領域での効果的な発色促進作用を有す試薬の開発は、臨床化学検査分野における実用面に重要な課題と

なっている。

[問題点を解決するための手段]

そこで、以前本発明者らは、増基性官能基を共有結合させた新規シクロデキストリン誘導体を用いて、アグリコンである各種ニトロフェノール誘導体を包埋し、中性ないし弱酸性条件下における発色効果を向上させる技術を開示した。(特開昭83-243101号公報)

該技術は実用的には充分な効果を得られるものであるが、本発明者らは、それに満足することなく更に検討を加えた。

該技術は $\alpha$ -又は $\beta$ -シクロデキストリンに、例えば、ジエチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基、ジメチルアミノプロピル基、アミノエチル基等を結合させたものである。明細書にも記述している通り、その導入個数はシクロデキストリン1分子に対し、1個ないし2個が共有結合されていることが確認でき、例えばジエチルアミノエチル基修飾シクロデキストリン(以下DE-CDともいう)を含む溶液中、4-ニトロフェノ

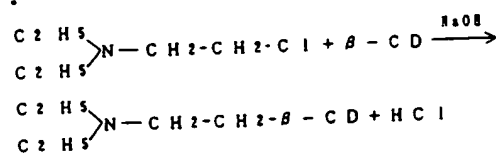
## 特開平4-100801(2)

合成基質は広い波長域(300~320nm)に吸収(波長400nm)を示さないが、4-ニトロフェノール領域において示す強い吸光ピーク・アニオンを示す。酵素反応を400nmの波長で、正確な条件下で測定しようとする場合には弱酸性フェノールはその解せず、吸光スペクトルもつ合成基質の吸光ラップしてしまい、誤差を生ずる。そこで、現行の測定とさせてから一定時

間のpH5.0、400nmにおける吸光度は、4-ニトロフェノールの紫外吸光度の30%以上に達し、必要充分な感度を得たのである。

上記特許に記載されているように増感性官能基を共有結合させたシクロデキストリン誘導体は、未修飾のシクロデキストリンに比し、多くの長所を持っていることが明らかになった。しかしながら、これらのシクロデキストリン誘導体をもってしても、測定pHが更に酸性にずれた場合、又はpKaの酸性側から中性側にシフトしているニトロフェノール誘導体に対しては、十分にニトロフェノール類を解離させることが出来ず、可視域における飛躍的な吸光度上昇が望まれるところであった。そこで、本発明者らは該技術をおし進め、シクロデキストリン1分子に対し平均3分子以上の増感性官能基を結合させる方法を見出し、これら3分子以上の増感性官能基が共有結合したシクロデキストリンの共存が従来のシクロデキストリン又は1ないし2分子の増感性官能基結合シクロデキストリンの共存に比べ、中性ないしは酸性領域

において4-ニトロフェノールを始めとする各種ニトロフェノール誘導体のpKaを極めて大きく酸性側にずらし、その結果として更に極大吸光スペクトルを長波長側にシフトさせ相乗的に顕著な発色効果をもたらすことを見出し本発明を完成した。β-シクロデキストリン1分子に平均3分子以上の増感性官能基を結合させるための合成法に関しては、本発明の為に増感性官能基としてジエチルアミノエテル基を選び、以下の原理によりそのシクロデキストリン結合体を完成した。



本反応において1分子のβ-シクロデキストリンに導入されるジエチルアミノエテル基の分子数はシクロデキストリンとジエチルアミノエテル基のモル比、反応温度、反応時間、反応pHにより大きく左右されることがわかった。すなわち、1

段]

1. 増感性官能基を共有結合したシクロデキストリン誘導体を用いてニトロフェノール類の酸性条件下における反応を示した。(特開昭

2. 効果を得られるものに満足することな

シクロデキストリンに、アル基、ジメチルアミノプロピル基、アミノ基である。明細書にも入量数はシクロデキスなないし2個が共有結合、例えばジエチルアミノストリン(以下DE-ストリン、4-ニトロフェノ

分子のβ-シクロデキストリンに平均3分子以上のジエチルアミノエテル基を結合させる為には、モル比でβ-シクロデキストリンに対しジエチルアミノエテルクロリドが望ましくは5以上、反応温度は20~70℃、反応時間として30分~10時間、反応pHはアルカリ性に保つことが必要で、特にpH10以上が望ましい反応条件であることがわかった。

同様にして、α-、γ-シクロデキストリンのポリDEAE結合体を得られる。また、ジエチルアミノエテル基以外にジメチルアミノエテル、ジメチルアミノプロピル、アミノエテル基等の結合体も得ることができる。このように3分子以上の増感性官能基で修飾されたシクロデキストリン、例えばポリジエチルアミノエテル化α-シクロデキストリン(以下ポリDE-αCDと略す。)、ポリジエチルアミノエテル化β-シクロデキストリン(以下ポリDE-βCDと略す。)、およびポリジエチルアミノエテル化γ-シクロデキストリン(以下ポリDE-γCDと略す。.)は意外にも

、通常のシクロデキストリンに比べはるかに水によく溶け実用に供し易いものであった。現在、特に安価で一般に用いられているβ-シクロデキストリンは比較的の水に難溶性でこの性質が臨床化学検査などにおける実用上の範囲を決めているものである。すなわち、難溶性の目的物質をシクロデキストリンの包埋により溶解せしめる時シクロデキストリン自身の溶解性によりその溶解度が限定されてしまうのである。具体的には特定酵素の活性を測定するためによく使用される合成基質の溶解の場合などである。加水分解酵素の多くの場合は難溶性のニトロフェノール誘導体が発色剤として酵素反応の経過観察のために結合されている。例えば、例示のN-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ測定のための合成基質である、4-ニトロフェニル(あるいは2-クロロ-4-ニトロフェニル)-N-アセチル-β-D-グルコサミニドの場合、β-シクロデキストリンの助けで必要量の溶解が試みられるが、シクロデキストリン自身の溶解性の悪さのためその目的を充分に果

たし得ない。それに比し、本発明によるポリDE-CD類はたやすく水に溶解させることができ、その包埋膜により上記基質等を十分に必要量溶かし得るのでこの面においても本発明に実用的価値を付加するものである。

更に本発明の本質である中性ないしは弱酸性条件下でのニトロフェノール誘導体に対する発色効果を種々の誘導体を用いて調べた。4-ニトロフェノール、2-クロロ-4-ニトロフェノール、5-ニトロサリチル酸、5-ニトロサリチル酸メチル、2, 4-ジニトロフェノール、3, 4-ジニトロフェノール等についてである。驚くべきことにこれらの中で最も中性ないしは特に弱酸性下で電離が微弱な、すなわちpH5.0付近においては、400nm付近での電離性の可視発色ピークが認められない4-ニトロフェノールでさえポリDE-CD類の1%以下の通常濃度の存在下でその400nm付近に大きな新しい電離性の発色ピークを出現させ、ポリDE-CD類の作用とその効果が顕著であることが示された。通常のシ

クロデキストリンではこれ程の効果は認められない。また、DEの導入が1ないし2分子の場合と比較しても効果は絶大なるものである。またポリDE-CD類は水への溶解性が更に良いため使用量を増やして効果的な増強ができる。また他のニトロフェノールについても1%以下の通常濃度でDE- $\alpha$ 、DE- $\beta$ と比較して顕著な可視発色効果が示された。特に2-クロロ-4-ニトロフェノールは中性ないし酸性下で4-ニトロフェノールに比べ、比較的発色がなされ易いものとして、最近それを結合させた特定酵素のための合成基質が供されているが、例えばpH5.0以下で酵素反応を行う前記のN-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニダーゼ等については、酵素反応の結果そのpHで生成する2-クロロ-4-ニトロフェノールの400nm付近における電離発色は、未結合のCDの場合は全く不十分で、またその基質としての溶解度を十分に維持できないため、その生成量を連続モニターできるほどの感度と精度をもたない。またDE-CDを用いても改善の余地は

残されている。しかるに、ここへのポリDE-CD類の添加は生成する2-クロロ-4-ニトロフェノールの吸収スペクトルを完全電離に近いかたちに出現せしめ発色させるので、理想的な状態での当酵素の連続モニター測定が行える。

前記の通りポリDE- $\alpha$ CD、ポリDE- $\beta$ CD及びポリDE- $\gamma$ CDは充分水に溶け易く、当合成基質の必要量を反応液に溶解できることと合わせ実用的に著しい効果を提供する。

以上の効果は、同様に、中性付近で反応を行う $\alpha$ -アミラーゼのための合成基質である、4-ニトロフェニル-マルトヘプタオシド、あるいは2-クロロ-4-ニトロフェニル-マルトペンタオシド等を用いて生成するニトロフェニル誘導体を400nm付近で連続モニターする $\alpha$ -アミラーゼの測定の場合、あるいは、よりpHの低い領域で酵素反応を行わせる酸性キスファターゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、エステラーゼ、アリルスルファターゼ等の測定においても、通常のシクロデキストリンに比し、はるかに効果的に

使用される。

以上ポリDE- $\alpha$ CD、ポリDE- $\beta$ CD及びポリDE- $\gamma$ CDについての本発明の効果を述べたが、他の増基性官能基を修飾したシクロデキストリン及び他の酵素反応のためのニトロフェノール誘導体を結合した他の合成基質を使用する場合においても、本発明の本質は同様である。更にニトロフェノール誘導体の1つである3, 4-ジニトロフェニル基を用いた合成基質による種々酵素の測定法においては、本発明のポリDE-CDとの組合せにより、両者の利点が相まって従来にない高精度な酵素活性測定を提供することができる。

以下、実施例により本発明の作用、効果をさらに詳しく説明する。

#### 実施例-1 ポリDE-CD類の合成方法

##### 1. ポリDE- $\alpha$ CDの合成方法

$\gamma$ -シクロデキストリン2.4gを4mlの濃塩酸水に懸濁させ、攪拌しながら水酸化ナトリウム1.5gを含む4mlの水溶液を滴下する。次にジエチルアミノエチルクロリド塩酸塩1.4gを

含む2  
応させ  
50cc  
を充填  
により  
Dを得  
チル基  
定、元  
料明し  
の基留  
ウム1  
にジエ  
を含む  
、反応  
化ナトリ  
。その  
のカル  
し、1  
リDE-  
いし4個

クロロ-4  
フェノ  
サリチル  
れた。

シクロデ  
無添加  
DE-  
ポリD  
DE-  
ポリD  
DE-  
ポリD

実施例-  
実施例  
基の結合  
- $\beta$ CD  
コハク酸  
中での3  
した結果

は認められな  
分子の場合と  
る。またポリ  
良いため使用  
。また他のニ  
の通常濃度で  
な可視部発色  
4-ニトロフ  
ニトロフェノ  
いものとして  
ための合成基  
。0以下で酵  
β-D-グル  
：反応の結果そ  
ニトロフェノ  
1発色は、未酵  
たその基質と  
ため、その生  
度と精度をも  
ら改善の余地は

DE-βCD及び  
用の効果を述べ  
たシクロデキス  
ニトロフェノー  
を使用する場合  
である。更にニ  
5.3, 4-ジニ  
による若干酵素  
リDE-CDと  
まって従来にな  
ことができる。  
用、効果をさら

#### 合成方法

gを4mlの蒸  
酸化ナトリウム  
滴下する。次に  
液量1.4gを

含む2mlの水溶液を滴下し、30℃で3時間反  
応させる。その後反応液を直径1.5cm、高さ  
50cmのクロマト管にセファデックスG-25  
を充填したものを用いてカラムクロマトグラフ  
により分子量別に分別し、1.5gのDE-αCD  
を得た。このDE-αCDはジエチルアミノエ  
テル基が1ないし2個結合していることが中和滴  
定、元素分析、プロトン核磁気共鳴の分析により  
判明した。次に、このDE-αCD 2gを4ml  
の蒸留水に懸濁させ、攪拌しながら水酸化ナトリ  
ウム1.2gを含む4mlの水溶液を加える。更  
にジエチルアミノエチルクロリド塩酸塩2.0g  
を含む2mlの水溶液を滴下し、50℃で5時間  
、反応液のpHが11を下回らないように水酸  
化ナトリウム溶液を随時添加しながら反応させる  
。その後反応液を前述のセファデックスG-25  
のカラムクロマトグラフにより分子量別に分別  
し、1.2gのポリDE-αCDを得た。このポ  
リDE-αCDはジエチルアミノエテル基が3な  
いし4個結合していることが中和滴定、元素分析

ロ-4-ニトロフェノール、2, 4-ジニ  
トロフェノール、5-ニトロサリチル酸、5-ニ  
トロサリチル酸メチルについて吸光度の増加が認め  
られた。

表1

シクロデキストリンの種類	吸光度
無添加	0.080
DE-αCD	0.281
ポリDE-αCD	0.477
DE-βCD	0.213
ポリDE-βCD	0.409
DE-γCD	0.183
ポリDE-γCD	0.386

#### 実施例-3 DE導入数によるpKへの効果

実施例1の2で合成したジエチルアミノエ  
テル基の結合個数の異なるDE-βCD及びポリDE  
-βCDのそれぞれの濃度が1%となる25mM  
コハク酸緩衝液を調製した。そしてこの各緩衝液  
中での3, 4-ジニトロフェノールのpKを測定  
した結果を表2に示す。

(以下余白)

の分析により判明した。同様の操作を繰り返すこ  
とにより、ジエチルアミノエテル基の導入個数を  
増やすことができる。

#### 2. ポリDE-βCDの合成方法

前述の合成法1において、α-シクロデキスト  
リンにかえ、β-シクロデキストリンを使用し同  
様の操作により、ポリDE-βCDを合成した。

#### 3. ポリDE-γCDの合成方法

前述の合成法1において、α-シクロデキスト  
リンにかえ、γ-シクロデキストリンを使用し同  
様の操作により、ポリDE-γCDを合成した。

#### 実施例-2 各ポリDE-CD類の4-ニトロフ ェノールに対する可視部発色効果

pH5.0の20mM酢酸緩衝液中における4  
-ニトロフェノールの400nmにおける吸光度  
を、シクロデキストリン無添加、1%DE-CD  
添加、実施例1で合成した各ポリDE-CDを1  
%添加のそれぞれを比較検討した結果を表1に示  
す。

同様にして4-ニトロフェノール以外の2-ク

表2

No.	DE導入数	pK
対照	無添加	5.4
1	1.8	4.7
2	3.0	4.4
3	3.8	4.2
4	4.5	4.1

(DE導入数は、中和滴定法による計算値)

#### 実施例-4 酵素反応への応用

以下の操作により、N-アセチル-β-D-グ  
ルコサミニダーゼ活性を測定した。

#### (1) 試薬の調製

- ・3, 4-ジニトロフェニル-N-  
アセチル-β-D-グルコサミニド：1.2mM
- ・コハク酸緩衝液(pH5.0)：25mM
- ・各ポリDE-βCD：1%

#### (2) 操作法及び結果

N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ液  
(シグマ社製ヒト胎盤の酵素で、活性値を50U  
/1に調整)100μlに、37℃で5分間加温  
した試薬3mlを加え反応させ、試薬ブランクを  
対照に5分間当たりの400nmにおける吸光度

変化を測定した。その結果を表3に示す。

表3

No.	DE導入数	吸光度変化 ( $\times 10^{-3}$ )
対照	無添加	5.0
1	1.8	10.7
2	3.0	13.6
3	3.8	14.7
4	4.5	15.1

## 〔発明の効果〕

以上から明らかな如く、本発明によれば増基性官能基を少なくとも3分子以上結合したシクロデキストリン誘導体は、ニトロフェノール誘導体の可視部における発色を著しく増強する効果を有し、ニトロフェノール誘導体を結合した合成基質を用いる各種の酵素活性測定方法に適用するとき、特にレート分析の精度を格段に向上させるという効果を有する。

特許出願人 株式会社ヤマトロン